

⑫

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

⑲ Numéro de dépôt: 88400555.4

⑤ Int. Cl. 4: **G 01 N 33/92**

**G 01 N 33/559, G 01 N 33/561**

⑳ Date de dépôt: 09.03.88

③① Priorité: 10.03.87 FR 8703259

④③ Date de publication de la demande:  
14.09.88 Bulletin 88/37

④④ Etats contractants désignés:  
AT BE CH DE ES GB GR IT LI LU NL SE

⑦① Demandeur: **LABORATOIRES SEBIA**  
23 rue Maximilien Robespierre  
F-92130 Issy-Les-Moulineaux (FR)

⑦② Inventeur: **Bellon, Franck**  
Appt. 2512 Tour Eve  
F-92800 Puteaux (FR)

**Fruchart, Jean-Charles**  
23 Domaine de la Hollande Ennetières en Weppes  
F-59390 Haubourdin (FR)

**Barouh, Guy**  
37 Boulevard Murat  
F-75016 Paris (FR)

⑦④ Mandataire: **Grosset-Fournier, Chantal Catherine et al**  
**SC Ernest Gutmann/Yves Plasseraud** 67 boulevard  
Hausmann  
F-75008 Paris (FR)

⑤④ **Nouveau procédé de dosage simultané d'au moins deux sous ensembles d'apolipoprotéines contenues dans un milieu biologique.**

⑤⑦ L'invention concerne un procédé de dosage simultané d'au moins deux sous-ensembles d'apolipoprotéines, appartenant respectivement à au moins deux groupes de particules lipoprotéiques et contenant une "apolipoprotéine commune", - le premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous-ensemble, - le deuxième groupe pouvant être constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et constituant le deuxième sous-ensemble ; lequel procédé consiste à mettre les deux sous-ensembles d'apolipoprotéine à doser en présence d'un mélange d'anticorps contenant

. d'une part des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble ( $Y_n$ ) en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe ;

. d'autre part des anticorps dirigés contre la susdite "apolipoprotéine commune", constituant le premier sous-en-

semble, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe et en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne deux frontières distinctes. Application à des kits de dosage.

## Description

NOUVEAU PROCÉDE DE DOSAGE SIMULTANÉ D'AU MOINS DEUX SOUS ENSEMBLES  
D'APOLIPOPROTEINES CONTENUES DANS UN MILIEU BIOLOGIQUE

L'invention a pour objet un nouveau procédé de dosage simultané d'au moins deux sous ensembles d'apolipoprotéines contenues dans un milieu biologique.

L'invention a également pour objet de nouveaux supports plans (plaques ou films) prêts à l'utilisation, et permettant la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

L'invention vise également des kits ou nécessaires de dosage pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

Enfin, l'invention vise également un procédé de dépistage in vitro de risques d'athérosclérose corrélés à des teneurs en apolipoprotéines déterminées, portées par des particules lipoprotéiques, et situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes des susdites apolipoprotéines correspondant à l'état physiologique d'un individu sain, en mettant en oeuvre le procédé de dosage selon l'invention.

Il est aujourd'hui parfaitement démontré que les dyslipoprotéinémies constituent le facteur prédisposant majeur pour le développement et la progression des lésions artérielles (Lipids Research Clinic Program. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering JAMA, 1984, 251:351-374 Ducimetière P., Richard J.L., Claude J.R., Warnet J.M. Les cardiopathies ischémiques. Incidence et facteurs de risque. In : L'Etude Prospective Parisienne, Paris, INSERM 1981 ; Fruchart J.C., Bertrand M., Parra H., Gentilini J.L., Boniface B., Lipoprotéines et apolipoprotéines plasmatiques. Intérêt de leur dosage dans le dépistage de l'athérosclérose coronarienne. Comparaison avec les informations fournies par la coronarographie. Nouv. Presse Méd., 1982, 111:3491-3494).

Les dosages du cholestérol et des triglycérides, qui font partie depuis longtemps de la panoplie des analyses biologiques, ont révélé leur insuffisance lorsqu'on s'est aperçu que le risque athérogène n'était pas le même selon la classe de lipoprotéines qui transporte ces lipides (Gordon T., Kannel W.B., Castelli W.P., Dawber T.R. Lipoproteins, cardiovascular disease and death. The Framingham study. Arch. Intern. Méd., 1981, 141:1128-1131).

L'utilisation de la classification des lipoprotéines en fonction de critères physicochimiques tels que la charge électrique, la densité, la taille ou l'interaction avec des polyanions a permis de révéler qu'il existait dans le plasma des lipoprotéines athérogènes (LDL) favorisant le dépôt de cholestérol dans les tissus et des lipoprotéines protectrices (HDL) captant le cholestérol tissulaire pour le ramener au foie en vue de son excrétion (Polonovski J., Beucler I. Structure et métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Pathol. Biol., 1983, 31:225-234).

La découverte de nombreuses apolipoprotéines, fractions protéiques des lipoprotéines, a conduit au développement de méthodes immunologiques permettant de les quantifier et de classer les lipoprotéines en fonction de leur composition protéique (Fruchart J.C., Clavey V., Vanhoutte G. Méthodes d'exploration biochimique des hyperlipoprotéinémies. Pathol. Biol., 1983, 31:235-245). C'est ainsi que les dosages de l'apolipoprotéine A-I, fraction protéique majeure des HDL, et de l'apolipoprotéine B, fraction protéique majeure des LDL sont entrés dans la pratique courante.

Cependant, l'importance de la fraction protéique des lipoprotéines (apolipoprotéines) dans le transport des lipides, les interactions lipoprotéines récepteurs (Brown M.S., Goldstein J.L. Lipoproteins receptors in the liver. J. Clin. Invest., 1983, 72:743-747) et la régulation de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines (Fielding C.J., Shore V.G., Fielding P.E. A protein cofactor of lecithin : cholesterol acyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, 46:1493-1498 ; Jahn C.E., Osborne J.C., Shaefer E.J., Brewer H.B. Activation of the enzyme activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. Eur. J. Biochem., 1983, 131:25-29 ; Assman G., Mensel H.J. Apolipoprotein disorders. Ric. Clin. Lab., 1982, 12:63-81 ; Catapano A.L. Apo C-II and LPL activity. Ric. Clin. Lab., 1982, 12:35-40 ; Polonovski J., Glangeaud D., Freundenthal M.C. La lipoprotéine lipase et son action sur les lipoprotéines de très basse densité In : Exposés annuels de biochimie médicale, Ed. Masson, 1982, 35:13-37) a conduit de nombreux auteurs (Fruchart J.C., Puchois P. Méthodes d'analyse des lipoprotéines. Ann. Biol. Clin., 1986, 44:551-555 ; Alaupovic P. The role of apolipoproteins in lipid transport processes. Ric. Clin. Lab., 1982, 12:3-21 ; Atmeh R.F., Shepherd J., Packard C.J. Subpopulations of apolipoproteins A-I in human high density lipoproteins. Their metabolic properties and response to drug therapy. Biochim. Biophys. Acta, 1983, 751:175-188 ; Salmon S., Van Wanbeke A., Theron L., Ayrault-Jarrier M., Polonovski J. Apolipoprotéines associées aux lipoprotéines B dans les lipoprotéines de basse densité du sérum humain. Biochim. Biophys. Acta, 1982, 710:297-305) à utiliser les apolipoprotéines comme marqueurs spécifiques pour la caractérisation des lipoprotéines. Selon ce concept, les lipoprotéines sont en fait un ensemble de particules composées de lipides associés à une apolipoprotéine (particule simple) ou à plusieurs apolipoprotéines (particule complexe). Les particules ainsi définies pourraient représenter l'unité de base du métabolisme des lipoprotéines et toute dyslipoprotéinémie pourrait être caractérisée par un profil distinct de particules lipoprotéiques.

Un certain nombre d'analyses immunologiques sophistiquées ont donc été développées pour quantifier les apolipoprotéines.

Ces méthodes utilisent l'immunoenzymologie et ne sont applicables que dans des laboratoires de

recherche.

Elles ont permis de montrer l'hétérogénéité fonctionnelle des lipoprotéines de haute et de basse densité. Par exemple, on a pu prouver que les HDL contiennent deux types de particules : celles qui contiennent l'apolipoprotéine AI et l'apolipoprotéine AII (LpAI:AII) et celles qui contiennent l'apolipoprotéine AI mais pas l'apolipoprotéine AII (LpAI).

Des travaux effectués sur culture cellulaire ont montré que seules les LpAI sont capables de capter le cholestérol tissulaire et donc d'être protectrices vis-à-vis de l'athérosclérose.

Une étude rétrospective sur sujets coronarographiés a en outre mis en évidence que les sujets à coronaires lésées présentaient une diminution significative des lipoprotéines LpA-I alors que les lipoprotéines LpA-I:A-II ne sont pas modifiées (Puchois P., Bertrand M., Lablanche J.M., Fruchart J.C. Decrease of plasma apo A-I in coronary artery disease is related to lipoprotein particles which contain apo A-I but not apo A-II *Circulation*, 1985, 72:III-199).

Enfin, l'étude de sujets consommant de l'alcool régulièrement, en les séparant en cinq groupes selon leur consommation alcoolique hebdomadaire, a montré que les lipoprotéines LpA-I diminuent proportionnellement à la consommation alcoolique, alors que les lipoprotéines LpA-II:A-I augmentent. L'augmentation du cholestérol HDL constatée classiquement lors de la consommation d'alcool correspondrait donc à un augmentation de la fraction LpA-II:A-I non protectrice (Puchois P., Ghahim N., Demarquilly C., Zylberberg G., Fruchart J.C. Effect of alcohol consumption on lipoprotein particles which contain apo A-I and apo A-II (LpA-I:A-II) and apo A-I but not apo A-II (LpA-I). *Circulation*, 1986, 74:II-383).

Des travaux comparables ont été réalisés sur les lipoprotéines de basse densité et montré l'athérogénicité des particules contenant uniquement l'apolipoprotéine B (LpB) et de celles contenant les apolipoprotéines B et C-III (LpB:C-III) ou B et E (LpB:E) (Fruchart J.C., Luyeye I., Parra H., Slimane M., Fievet C. Les lipoprotéines athérogènes et leur détection immunologique. *Bull. Acad. Natle Méd.*, 1985, 169: 719-728).

La mise au point de nouvelles méthodes d'analyse moléculaire des particules permet donc d'envisager un diagnostic plus précoce et plus précis du risque d'athérosclérose que l'hétérogénéité des lipoprotéines définies par les critères physicochimiques ne permettrait pas. Parallèlement, ces nouvelles techniques permettent de préciser les mécanismes d'action des médicaments normolipoprotéïnémisants au niveau moléculaire (Doust-Blazy P., Fievet C., Fruchart J.C., Slimane M., Drouin P., Puchois P., Bernadet P. Effect of fenofibrate on lipoprotein particles predictive of coronary. *Arteriosclerosis*, 1986, 6/5:564).

Les méthodes proposées jusqu'alors pour l'analyse moléculaire des particules lipoprotéiques sont les suivantes.

On a ainsi proposé la méthode d'immunoprécipitation séquentielle (Alaupovic P. - Mapping of the lipoprotein particles of very low and low densities characterized by apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E as their protein moieties. In : Journées du Gerli, Le Touquet, 19-21 juin 1984). Cette méthode permet de quantifier directement les particules lipoprotéiques, mais est longue et trop complexe pour être appropriée en biologie clinique.

On a également développé une méthode immunoenzymatique à double détermination d'anticorps, qui permet l'analyse quantitative des particules au niveau moléculaire (Fruchart J.C., Puchois P. Méthodes d'analyse des lipoprotéines. *Ann. Biol. Clin.*, 1986, 44:551-555 ; Puchois P., Bertrand M., Lablanche J.M., Fruchart J.C. Decrease of plasma Apo A-I in coronary artery disease is related to lipoprotein particles which contain Apo A-I but not Apo A-II In : 58th Scientific Session of the American Heart Association, Washington, 11-14 novembre 1985. *Arteriosclerosis*, 1985, 5-5, 513).

Cette technique repose sur le fait que les anticorps spécifiques d'une apolipoprotéine donnée, fixés sur une plaque à microtitration retiennent les particules lipoprotéiques qui contiennent cette apolipoprotéine.

L'analyse quantitative des autres apolipoprotéines présentes sur les particules retenues est alors directement réalisée sur la plaque par addition de leurs anticorps correspondants, marqués par une enzyme.

Cette méthode est rapide et fiable, mais nécessite l'utilisation d'un matériel dont ne disposent pas tous les laboratoires.

On sait également que dans un gel sous forme de plaque, contenant uniformément un anticorps spécifique d'un antigène déterminé, lorsqu'on fait diffuser l'antigène correspondant (immunodiffusion radiale selon Mancini) ou migrer dans un champ électrique l'antigène correspondant (électroimmunodiffusion selon Laurell) il y a formation d'un précipité visible respectivement sous forme d'un anneau ou d'un pic.

Les surfaces couvertes par les précipités sont proportionnelles à la quantité d'antigène mise en jeu et en comparant les résultats obtenus avec des concentrations connues du même antigène, il est possible d'en déduire la quantité d'antigène à doser.

Ces techniques sont également applicables pour doser deux ou plusieurs antigènes indépendants, c'est-à-dire non liés entre eux, en incorporant à ces gels deux ou plusieurs anticorps spécifiques vis-à-vis de chacun des antigènes (Fruchart J.C., Nora I., Cachera C., Clavey V., Duthilleul P., and Moschetto Y. Simultaneous measurement of plasma apolipoproteins A1 and B by electrimunoassay. *Clin Chem* 28/1 (1982) 59-62 et CB Laurell. A Screening test for  $\alpha$  1 antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29 (1972) 247).

Il est ensuite nécessaire a posteriori d'être en mesure de distinguer les immunoprécipités relatifs à chacun des antigènes. Ce repérage peut être effectué par exemple en utilisant une propriété spécifique d'un antigène ou par marquage d'un anticorps déterminé ; ou bien encore d'après les intensités relatives des lignes de précipitation.

On sait également que si les antigènes ne sont pas indépendants, (c'est-à-dire s'il existe une liaison entre

eux) le dosage simultané n'est pas possible.

Un cas intermédiaire entre les antigènes liés et les antigènes indépendants est constitué notamment par celui des apolipoprotéines, qui sont telles qu'une apolipoprotéine déterminée est portée par des particules lipoprotéiques, différentes entre elles par leur charge en autres apolipoprotéines.

5 Deux particules lipoprotéiques, qui portent toutes les deux une même apolipoprotéine déterminée, sont différentes entre elles lorsque l'une des particules contient au moins en outre une autre apolipoprotéine différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par l'autre particule lipoprotéique.

Ce qui vient d'être dit ci-dessus peut être généralisé pour définir que "n" particules lipoprotéiques portant toutes une même apolipoprotéine déterminée, sont différentes entre elles.

10 Dans ce cas, les particules lipoprotéiques sont indépendantes, mais les apolipoprotéines ne sont pas indépendantes.

Les techniques de dosage des apolipoprotéines sont celles évoquées ci-dessus, mais à ce jour, on ne connaît aucune technique simple et fiable de laboratoire susceptible d'être utilisée en analyse clinique de routine, et ne nécessitant ni traitement préalable du milieu biologique contenant des antigènes liés, 15 notamment des apolipoprotéines à doser, ni matériel sophistiqué.

L'un des aspects de l'invention est de proposer un nouveau procédé de dosage simultané d'un ou plusieurs sous ensembles d'apolipoprotéines, contenus dans un milieu biologique, ne nécessitant pas de modification préalable du milieu biologique, pour éliminer les particules indésirables.

20 L'un des aspects de l'invention est de proposer un nouveau procédé de dosage direct d'un ou plusieurs sous ensembles d'apolipoprotéines, simple à mettre en oeuvre dans le cadre d'analyse clinique de routine.

L'un des autres aspects de l'invention est de proposer un procédé rapide et fiable de dosage d'un ou plusieurs sous ensembles d'apolipoprotéines.

L'un des aspects de l'invention est de proposer un nouveau procédé de dosage d'un ou plusieurs sous ensembles d'apolipoprotéines ne nécessitant pas l'utilisation d'un matériel sophistiqué.

25 L'un des autres aspects de l'invention est de proposer des supports plans tels que plaques ou films prêts à l'emploi pour la mise en oeuvre du dosage direct d'un ou plusieurs sous ensembles d'apolipoprotéines, contenues dans un milieu biologique, sans traitement préalable dudit milieu biologique.

L'un des autres aspects de l'invention est de proposer un kit ou nécessaire de dosage permettant le dosage direct simple, rapide et fiable d'un ou plusieurs sous ensembles d'apolipoprotéines.

30 Ces différents aspects de l'invention reposent sur la constatation tout à fait inattendue que deux groupes de particules (a) et (b), distinctes et indépendantes, (a) portant un antigène I, et (b) portant le même antigène I et un autre antigène II, différent de l'antigène I, lesquelles particules (a) et (b) sont contenues dans un milieu biologique non préalablement traité peuvent se comporter, vis-à-vis de la précipitation, lorsqu'elles sont mises en présence d'un mélange d'anticorps anti I et d'anticorps anti II, dans des conditions appropriées, de la même façon que si de façon séparée, les particules (b) étaient mises en présence d'anticorps anti II et les 35 particules (a) étaient mises en présence d'anticorps anti I.

On constate donc de façon tout à fait inattendue que, dans des conditions appropriées, les particules (b) comportant à la fois l'antigène I et l'antigène II ne sont précipitées que par les anticorps anti II, et que la présence d'anticorps anti I n'entraîne pas la précipitation de certaines particules (b), et ne perturbe pas la 40 précipitation des particules (b) par les anticorps anti II, ce qui permet le dosage respectivement de l'antigène I porté par les particules (a) et de l'antigène II.

Plus précisément, cette invention repose sur la constatation tout à fait inattendue qu'à partir d'un milieu biologique non préalablement traité et contenant deux groupes de particules (a) et (b) distinctes et indépendantes, (a) portant un antigène I et (b) portant le même antigène I et un autre antigène II et en 45 incorporant dans un gel d'immunodiffusion un mélange d'anticorps anti I et d'anticorps anti II, dans des proportions telles que les anticorps anti II soient en excès par rapport aux anticorps anti I, on obtient deux frontières de précipitation, telles que celle qui est en deça de l'autre correspond à la précipitation des particules (b).

Le procédé selon l'invention de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque de 50 sous-ensembles d'apolipoprotéines, appartenant respectivement à des groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune", et pouvant être définis de la façon suivante :

- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", cette apolipoprotéine commune portée par toutes les 55 particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous-ensemble,

- le ou les éventuels groupes, ci-après désignés par groupes intermédiaires, étant tels qu'ils sont constitués par des particules lipoprotéiques dont une partie ou toutes, portent l'apolipoprotéine commune définie ci-dessus, lesquelles particules lipoprotéiques portent toutes, en outre, au moins une apolipoprotéine 60 différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et dans le cas de plusieurs groupes intermédiaires, les particules lipoprotéiques constituant respectivement chaque groupe intermédiaire portant au moins une apolipoprotéine différente de celles portées par les particules lipoprotéiques du ou des autres groupes intermédiaires, cette ou ces 65 apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques de chacun des groupes intermédiaires et différentes de l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble, différentes des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et différente des éventuelles

autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques des autres groupes intermédiaires constituant le ou les sous ensembles intermédiaires, le dernier groupe étant tel que :

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et contenant, en outre, au moins une apolipoprotéine différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et différentes des éventuelles apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques des éventuels groupes intermédiaires, cette ou ces apolipoprotéine(s) différente(s) de l'apolipoprotéine commune et différente(s) des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et différentes des éventuelles apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques des éventuels groupes intermédiaires, constituant le dernier sous-ensemble ;

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et porte en outre au moins une apolipoprotéine différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et différentes des éventuelles apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques des éventuels groupes intermédiaires, et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite apolipoprotéine commune définie ci-dessus, mais porte l'une au moins des apolipoprotéines portées par la partie des particules lipoprotéiques susdéfinie, et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par le premier groupe de particules lipoprotéiques et différentes des éventuelles apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques des éventuels groupes intermédiaires, cette ou ces apolipoprotéines différentes des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et différentes des éventuelles apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques des éventuels groupes intermédiaires constituant le dernier sous ensemble ;

caractérisé en ce que :

- on met le milieu biologique contenant les sous-ensembles d'apolipoprotéines à doser en présence d'un mélange d'anticorps contenant

. d'une part des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le dernier sous-ensemble en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du dernier groupe (portant les apolipoprotéines constituant le dernier sous-ensemble) ;

. d'autre part, éventuellement, des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le ou les sous ensembles intermédiaires en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du ou des éventuels groupes intermédiaires (portant les apolipoprotéines constituant les sous ensembles intermédiaires) ;

. d'autre part des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine commune sus-définie, constituant le premier sous ensemble, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe (portant l'apolipoprotéine constituant le premier sous-ensemble) ;

- la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du dernier groupe (portant les apolipoprotéines constituant le dernier sous ensemble), étant en excès par rapport à la quantité des éventuels susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du ou des éventuels groupes intermédiaires (portant les apolipoprotéines constituant le ou les éventuels sous ensembles intermédiaires) ;

- la ou les quantités d'anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques des éventuels groupes intermédiaires étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe (portant l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble), et dans le cas de plusieurs groupes intermédiaires, les quantités d'anticorps nécessaires à la précipitation des groupes intermédiaires, étant respectivement en excès les uns par rapport aux autres selon un ordre prédéterminé ;

dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne au moins deux frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les sous-ensembles à doser correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques portant les apolipoprotéines constituant le dernier sous-ensemble et la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques portant l'apolipoprotéine constituant le premier sous-ensemble, et la ou les frontières éventuelles d'immunodiffusion à une distance intermédiaire entre la frontière la plus proche et la frontière la plus éloignée sus mentionnées, correspondant à la précipitation des éventuelles particules lipoprotéiques portant la ou les apolipoprotéines constituant les sous ensembles intermédiaires ;

- on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu biologique étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des sous-ensembles.

On rappelle ci-après qu'une particule lipoprotéique précipite sous l'effet d'une réaction antigène-anticorps intervenant entre l'une des apolipoprotéines portées par la particule lipoprotéique et l'anticorps dirigé contre la susdite apolipoprotéine, t que le dosage concerne l'apolipoprotéine portée par la susdite particule lipoprotéique.

On a constaté de façon inattendue que les frontières d'immunodiffusion, (correspondant respectivement à la précipitation du premier groupe de particules lipoprotéiques, du ou des éventuels groupes intermédiaires

de particules lipoprotéiques et du dernier groupe de particules lipoprotéiques auxquelles appartiennent respectivement le premier sous ensemble d'apolipoprotéines à doser, l'ou les éventuels sous ensembles intermédiaires d'apolipoprotéines à doser et le dernier sous ensemble d'apolipoprotéines à doser), lorsque le milieu biologique est mis sans traitement préalable en présence d'un mélange d'anticorps définis ci-dessus, sont identiques aux frontières d'immunodiffusion obtenues dans des conditions, ou après avoir séparé les

- d'une part le premier groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous ensemble défini ci-dessus, en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe non séparées du milieu biologique et portant l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble, on met

- d'autre part le ou les éventuels groupes intermédiaires de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines constituant le ou les éventuels sous ensembles intermédiaires définis ci-dessus, en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du ou des éventuels groupes intermédiaires non séparées du milieu biologique et portant les éventuelles apolipoprotéines constituant le ou les éventuels sous ensembles intermédiaires, on met

- d'autre part le dernier groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines constituant le dernier sous ensemble défini ci-dessus en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du dernier groupe, non séparées du milieu biologique et portant les apolipoprotéines constituant le dernier sous ensemble.

En ce qui concerne les éventuelles frontières d'immunodiffusion intermédiaires, elles sont positionnées les unes par rapport aux autres dans l'ordre prédéterminé des excès d'anticorps mentionnés ci-dessus, la frontière d'immunodiffusion intermédiaire la plus proche de la frontière d'immunodiffusion correspondant à la précipitation du dernier groupe étant celle qui correspond à la précipitation d'un groupe intermédiaire par les anticorps correspondants, dont la quantité est en excès par rapport à toutes les autres quantités d'anticorps nécessaires à la précipitation des autres groupes intermédiaires.

En d'autres termes, un pic correspondant à la précipitation d'un groupe intermédiaire de particules lipoprotéiques se trouve en deça d'un autre pic, correspondant à la précipitation d'un autre groupe intermédiaire de particules lipoprotéiques, lorsque la quantité d'anticorps entraînent à la précipitation du premier groupe intermédiaire dont question ci-dessus est en excès par rapport à la quantité d'anticorps entraînent la précipitation de l'autre groupe intermédiaire.

Le procédé de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque d'au moins trois sous-ensembles d'apolipoprotéines, appartenant respectivement à des groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces trois groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune", et pouvant être définis de la façon suivante :

- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", et portant d'éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$ , cette "apolipoprotéine commune" portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous-ensemble,

- un autre groupe, ci-après désigné par deuxième groupe ou groupe intermédiaire, étant tel que :

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus, et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous ensemble ou le sous ensemble intermédiaire,

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont d'une part une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune", constituant le premier sous ensemble, et porte, en outre, au moins une apolipoprotéine  $Z_p$ , différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune", mais porte au moins une des apolipoprotéines  $Z_p$  portées par la partie des particules lipoprotéiques sus-définie et différentes des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par le premier groupe de particules lipoprotéiques, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Z_p$  constituant le deuxième sous ensemble, ou le sous ensemble intermédiaire,

- le troisième groupe, ou dernier groupe, étant tel que

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et contenant en outre au moins une apolipoprotéine  $W_q$ , différente d'une part des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et d'autre part des apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $W_q$  constituant le troisième sous-ensemble, ou dernier sous ensemble ;

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" et porte en outre au moins une apolipoprotéine  $T_i$  différente à la fois des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et des apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune", mais porte l'une au moins des apolipoprotéines  $T_i$  portées par la partie des particules lipoprotéiques sus-définie, cette ou ces apolipoprotéines  $T_i$  constituant le troisième sous-ensemble, ou dernier sous ensemble ;

caractérisé en ce que :

- on met le milieu biologique contenant les sous-ensembles à doser en présence d'un mélange d'anticorps contenant
    - . des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le troisième ou dernier sous ensemble en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du troisième ou dernier groupe 5
    - . des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble, ou sous ensemble intermédiaire, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, ou groupe intermédiaire ;
    - . des anticorps dirigés contre "l'apolipoprotéine commune" aux sous-ensembles, et constituant le premier sous ensemble, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe ; 10
  - la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du troisième ou dernier groupe étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ou groupe intermédiaire, cette dernière quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ou groupe intermédiaire étant elle-même en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques portant "l'apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne trois frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les sous-ensembles à doser, correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du troisième ou dernier groupe, la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, la frontière d'immunodiffusion intermédiaire entre la frontière la plus proche et la frontière la plus éloignée sus-mentionnées correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ; 20
  - on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des trois frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des trois sous ensembles. 25
- Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, le groupe sus-désigné par deuxième groupe ou groupe intermédiaire est de préférence constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus, et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous ensemble ou le sous ensemble intermédiaire. 30
- Le procédé selon l'invention de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque d'au moins deux sous ensembles d'apolipoprotéines, appartenant respectivement à au moins deux groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces deux groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune", 35
- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", et portant d'éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$ , cette apolipoprotéine commune portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous-ensemble,
  - l'autre groupe, ci-après désigné par deuxième groupe étant tel que : 40
    - soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous-ensemble ;
    - soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble et porte, en outre, au moins une apolipoprotéine  $Z_p$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble mais porte l'une au moins des apolipoprotéines  $Z_p$  portées par la partie des particules lipoprotéiques susdéfinie et différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par le premier groupe de particules lipoprotéiques, cette ou ces apolipoprotéines  $Z_p$  constituant le deuxième sous-ensemble ; 45
- caractérisé en ce que : 50
- on met le milieu biologique contenant les deux sous-ensembles d'apolipoprotéine à doser en présence d'un mélange d'anticorps contenant 55
    - . d'une part des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble ( $Y_n$  ou  $Z_p$ ) en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe ;
    - . d'autre part des anticorps dirigés contre la susdite "apolipoprotéine commune", constituant le premier sous-ensemble, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe ;
  - la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne deux frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les deux sous-ensembles à doser correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe et la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la 60 65



précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ces deux frontières étant respectivement identiques à celles obtenues dans les conditions où, après avoir séparé les deux groupes de particules lipoprotéiques contenant respectivement le premier et le deuxième sous-ensembles d'apolipoprotéines, on met, d'une part, le premier groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous ensemble défini ci-dessus, en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe, non séparées du milieu biologique et portant l'apolipoprotéine constituant le premier sous-ensemble, et on met, d'autre part, le deuxième groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines constituant le deuxième sous ensemble défini ci-dessus, en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, non séparées du milieu biologique et portant les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble ;

- on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des deux frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu biologique étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des deux sous-ensembles.

On a constaté de façon inattendue que les frontières d'immunodiffusion correspondent à la précipitation respective de chacun des groupes de lipoprotéines auxquelles appartiennent, comme indiqué ci-dessus, respectivement chacun des sous ensembles d'apolipoprotéine à doser.

On donne ci-après, à titre d'exemple, la constitution de trois sous ensembles d'apolipoprotéines à doser, appartenant à trois groupes de particules lipoprotéiques.

Le premier sous ensemble est constitué par une apolipoprotéine, portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe et qui est également portée par une partie au moins des particules lipoprotéiques du deuxième et du troisième groupe, ou qui est portée par toutes les particules lipoprotéiques du deuxième groupe et par une partie au moins des particules lipoprotéiques du troisième groupe.

Le deuxième sous ensemble est constitué par une apolipoprotéine différente de l'apolipoprotéine qui constitue le premier sous ensemble, mais portée par une partie au moins des particules lipoprotéiques du troisième groupe.

Le troisième sous ensemble est constitué par des apolipoprotéines différentes des apolipoprotéines constituant respectivement le premier et le deuxième sous ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées sur les particules lipoprotéiques du premier et du deuxième groupe.

Le procédé selon l'invention de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque de deux sous ensembles d'apolipoprotéine, appartenant respectivement à deux groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces deux groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune",

- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", et portant d'éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$ , cette apolipoprotéine commune portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous ensemble, et l'autre groupe,

ci-après désigné par deuxième groupe étant tel que :

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous-ensemble ;

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" du premier groupe et porte en outre au moins une apolipoprotéine  $Z_p$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble, mais porte l'une au moins des apolipoprotéines  $Z_p$  portées par la partie des particules lipoprotéiques susdéfinie et différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par le premier groupe de particules lipoprotéiques, cette ou ces apolipoprotéines  $Z_p$  constituant le deuxième sous-ensemble ;

caractérisé en ce que :

- on met le milieu biologique contenant les deux sous-ensembles d'apolipoprotéine à doser en présence d'un mélange d'anticorps contenant

. d'une part des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous ensemble ( $Y_n$  ou  $Z_p$ ) en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe ;

. d'autre part des anticorps dirigés contre "l'apolipoprotéine commune" aux deux sous-ensembles en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe ;

- la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne deux frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les deux sous-ensembles à doser correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe et la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ces deux frontières étant respectivement



identiques à celles obtenues dans les conditions où, après avoir séparé les deux groupes de particules lipoprotéiques contenant respectivement le premier et le deuxième sous-ensembles d'apolipoprotéines, on met, d'une part, le premier groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine commune du premier groupe en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques et non séparées du milieu biologique, portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, et on met, d'autre part, le deuxième groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, différente(s) de l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques et non séparées du milieu biologique, portant les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble ;

- on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des deux frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu biologique étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des deux sous-ensembles.

Le sous ensemble d'apolipoprotéine qui a été désigné ci-dessus, et qui sera désigné dans la suite par premier sous ensemble, est constitué d'une seule apolipoprotéine, qui est en fait l'apolipoprotéine commune à toutes les particules lipoprotéiques du groupe de particules désigné, dans ce qui précède et ce qui suit, par premier groupe de particules lipoprotéiques. Ceci n'exclut pas que les particules lipoprotéiques du premier groupe contiennent également d'autres apolipoprotéines.

Le sous ensemble d'apolipoprotéines qui a été désigné, dans ce qui précède et ce qui suit, par deuxième sous ensemble, est constitué d'une ou plusieurs apolipoprotéines, différentes d'une part de l'apolipoprotéine commune définie ci-dessus et différentes d'autre part des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe.

Cependant, la ou les apolipoprotéines du deuxième sous ensemble sont portées par des particules lipoprotéiques, dont une partie au moins porte la susdite apolipoprotéine commune.

Cependant, la susdite apolipoprotéine commune, qui est portée dans une partie au moins des particules lipoprotéiques du deuxième groupe, ne fait pas partie du deuxième sous ensemble d'apolipoprotéine.

Le deuxième groupe de particules lipoprotéiques peut donc avantageusement être constitué

- soit par des particules lipoprotéiques contenant toutes l'apolipoprotéine commune, et au moins une apolipoprotéine différente de l'apolipoprotéine commune et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe,

- soit par des particules dont une partie contient la susdite apolipoprotéine commune et, en outre, au moins une apolipoprotéine différente de cette apolipoprotéine commune, et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et dont les reste des particules lipoprotéiques ne contient pas la susdite apolipoprotéine commune, mais contient au moins une apolipoprotéine identique à celle définie dans la susdite partie comme étant différente de l'apolipoprotéine commune et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, le premier sous ensemble est constitué d'une seule apolipoprotéine portée par des particules lipoprotéiques libres et identiques entre elles, constituant le premier groupe.

On définit par particule lipoprotéique libre, une particule ne contenant qu'une seule apolipoprotéine.

Selon un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, le premier groupe est constitué d'une part par des particules lipoprotéiques libres et identiques entre elles, portant l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous ensemble, et d'autre part par des particules lipoprotéiques complexes portant, outre la susdite apolipoprotéine commune, au moins une apolipoprotéine différente de la susdite apolipoprotéine commune et différente des apolipoprotéines constituant le deuxième sous ensemble.

Par particules lipoprotéiques complexes, on désigne une particule portant au moins deux apolipoprotéines.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, le deuxième sous-ensemble est constitué par une apolipoprotéine différente de l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, laquelle apolipoprotéine constituant le deuxième sous ensemble est portée par des particules lipoprotéiques complexes, portant en outre toutes la susdite apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, le deuxième sous-ensemble est constitué par au moins une apolipoprotéine différente de l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, laquelle apolipoprotéine du deuxième sous ensemble est portée d'une part par des particules lipoprotéiques complexes, portant en outre l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble, et est portée d'autre part par des particules lipoprotéiques simples ou complexes, ne portant pas l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble.

En ce qui concerne le milieu biologique, il s'agit notamment du sang.

Comme anticorps, on peut utiliser des anticorps monoclonaux, des anticorps polyclonaux ou bien encore des anticorps oligoclonaux, c'est-à-dire des anticorps obtenus par immunisation avec des peptides de

synthèse copiant la structure des apolipoprotéines.

En ce qui concerne l'immunodiffusion, on peut avoir recours à la méthode d'électroimmunodiffusion de Laurell, comme par exemple décrite dans Clin. Chem. 1974, 20(6), 676-681.

Les frontières d'immunodiffusion obtenues sont alors des contours de pics. Etant donné que les surfaces couvertes par les particules lipoprotéiques précipitées sont proportionnelles aux quantités d'apolipoprotéines à doser, et que les pics ont sensiblement tous la même base, les quantités d'apolipoprotéines à déterminer par rapport à des pics obtenus à partir d'un milieu biologique étalon, sont déduites d'après la hauteur des pics.

Cette méthode est particulièrement avantageuse car elle est rapide.

En ce qui concerne l'immunodiffusion, on peut avoir recours à la méthode d'immunodiffusion radiale selon Mancini, telle que par exemple décrite dans Mancini G. Carbonara AO, et Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 1965, 2, 235.

Les frontières d'immunodiffusion sont des cercles, correspondant à des contours d'anneaux.

Etant donné que les surfaces couvertes par les particules lipoprotéiques précipitées sont proportionnelles aux quantités d'apolipoprotéines à doser, les quantités d'apolipoprotéines à déterminer par rapport à des anneaux obtenus à partir d'un milieu biologique étalon, sont déduites d'après le carré du diamètre des cercles correspondants.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, la quantité minimale à utiliser d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est déterminée dès l'apparition de deux frontières distinctes d'immunodiffusion.

Dans le cadre de l'invention, la quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble nécessaire à faire précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, est ajoutée en excès par rapport à la quantité d'anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, nécessaire à faire précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe, ce qui donne une hauteur de pic inférieure à la hauteur du pic résultant de la précipitation du premier groupe.

La quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble à ajouter pour faire précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, n'est pas limitée en valeur maximale.

Cependant, au fur et à mesure que l'on augmente la quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, la hauteur du pic correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe diminue, et il existe une quantité d'anticorps dirigés contre les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, à partir de laquelle les particules lipoprotéiques du deuxième groupe sont précipitées sur le point de dépôt du milieu biologique.

Au delà de cette quantité, il n'y a plus diffusion des particules lipoprotéiques du deuxième groupe. Dans ce cas, seule l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble est dosée.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, la quantité d'anticorps dirigés contre la, ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, est située dans une gamme dont la valeur minimale est déterminée dès l'apparition de deux frontières distinctes d'immunodiffusion et dont la valeur maximale est déterminée dès que les particules lipoprotéiques portant les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble ne diffusent plus et sont précipitées sur le point de dépôt du milieu biologique, la frontière d'immunodiffusion correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe n'étant pas modifiée lorsque la quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est supérieure à la valeur minimum à partir de laquelle on observe l'apparition de deux frontières distinctes d'immunodiffusion.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, la quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est telle que la distance maximale entre le point de dépôt et la frontière d'immunodiffusion correspondant la précipitation des particules lipoprotéiques contenant les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est d'environ 1/2 à environ 1/8, avantageusement d'environ 1/3 à environ 1/4, de la distance maximale entre le point de dépôt et la frontière d'immunodiffusion correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques contenant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, l'étalonnage est effectué à partir d'un milieu dans lequel le premier sous-ensemble contient une quantité connue (A) d'apolipoprotéine, laquelle est également portée par une partie au moins des particules lipoprotéiques du deuxième groupe, le deuxième sous-ensemble contient une ou des quantités connues (B) d'apolipoprotéine(s) différente(s) de l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe :

- en mettant sur la plaque des anticorps dirigés respectivement contre chacune des apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble en quantité nécessaire pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, chacune de ces quantités étant respectivement en excès par rapport aux anticorps nécessaires à précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe, l'excès en anticorps dirigés contre chacune des apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble pouvant être exprimé par la relation suivante :

$$V_{2i} T_{2i} \times \frac{B_i}{A} \text{ supérieur à } V_1 T_1,$$

dans laquelle  $V_1$ ,  $T_1$  représentent respectivement le volume et le titre des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble et  $V_2$ ,  $T_2$  représentent respectivement les volumes et les titres des anticorps dirigés respectivement contre chacune des apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble.

Lorsqu'on utilise la technique d'électroimmunodiffusion, étant donné que l'erreur relative de mesure de la hauteur d'un pic est d'autant plus faible que la hauteur du pic est plus élevée, il convient de profiter au mieux des dimensions utiles de la plaque pour les pics.

Pour ce faire, on détermine :

1°) la quantité d'anticorps  $V_1$ , (destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, laquelle apolipoprotéine est également portée par une partie au moins des particules lipoprotéiques du deuxième groupe), pour que la hauteur du pic obtenue soit  $H_1$ , cette détermination ayant lieu en mettant sur la plaque une quantité d'anticorps  $V_1$  correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ce qui donne une hauteur  $h_1$ , la quantité  $V_1$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_1 = x \% \frac{h_1 v_1}{H_1}$$

$x\%$  représentant le pourcentage de l'apolipoprotéine constituant le premier sous-ensemble, par rapport à la quantité totale de cette apolipoprotéine contenue dans le milieu, et on détermine

2°) la quantité d'anticorps  $V_2$  (destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, lesquelles sont différentes de l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe), pour que la hauteur du pic obtenue soit  $H_2$ , cette détermination ayant lieu en mettant sur la plaque une quantité d'anticorps  $v_2$  correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe, ce qui donne une hauteur  $h_2$ , la quantité  $V_2$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_2 = \frac{h_2 v_2}{H_2}$$

Lorsqu'on utilise la technique d'immunodiffusion radiale on a intérêt à ce que le diamètre de l'anneau soit le plus grand possible étant donné que l'erreur relative sur sa mesure est d'autant plus faible que celui-ci est plus grand.

Pour profiter au mieux des dimensions de la plaque, on procède comme suit.

On détermine :

1°) la quantité d'anticorps  $v_1$  (destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, laquelle apolipoprotéine est également portée par une partie au moins des apolipoprotéines du deuxième groupe), pour que le diamètre de l'anneau obtenu soit  $D_1$ , cette détermination ayant lieu en mettant sur la plaque une quantité d'anticorps  $v_1$  correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ce qui donne un diamètre  $d_1$ , la quantité  $V_1$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_1 = x\% v_1 \frac{d_1^2}{D_1^2}$$

x% représentant le pourcentage de l'apolipoprotéine constituant le premier sous-ensemble, par rapport à la quantité totale de cette apolipoprotéine contenue dans le milieu, et on détermine

2°) la quantité d'anticorps  $V_2$  (destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, lesquelles sont différentes de l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble et différentes des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe), pour que le diamètre de l'anneau obtenu soit  $D_2$ , cette détermination ayant lieu en mettant sur la plaque une quantité d'anticorps  $v_2$  correspondant à la précipitation des apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, ce qui donne un rayon  $d_2$ , la quantité  $V_2$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_2 = v_2 \frac{d_2^2}{D_2^2}$$

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, le premier sous-ensemble est constitué par l'apolipoprotéine A I, portée par les particules lipoprotéiques LP A I et LP A I:E, constituant le premier groupe et le deuxième sous-ensemble est constitué par l'apolipoprotéine A II, portée par les particules lipoprotéiques LP A I:A II et LPE:A II, constituant le deuxième groupe, caractérisé en ce que l'on met le milieu contenant les deux sous ensembles à doser en présence d'un mélange d'anticorps respectivement dirigés contre l'apolipoprotéine A II (anticorps anti A II), et contre l'apolipoprotéine A I (anticorps anti A I), dans des conditions telles que les anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine A II soient en excès par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine A I, cet excès correspondant notamment au fait que le produit de la valeur du volume d'anticorps anti A II mis sur la plaque par la valeur du titre des anticorps anti A II, est supérieur au produit de la valeur du volume d'anticorps anti A I mis sur la plaque par la valeur du titre des anticorps anti A I, parce que pour un sujet normal, la quantité d'apolipoprotéine A I portée par les particules LPAI et LPAI:E est sensiblement la même que la quantité d'apolipoprotéines  $A_2$  totale).

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, le premier sous-ensemble est constitué par l'apolipoprotéine B, portée par les particules lipoprotéiques LPB, constituant le premier groupe et le deuxième sous-ensemble est constitué par les deux apolipoprotéines E et C III, portées par les particules lipoprotéiques LPB:E, LPB:CIII, LPE:CI:CII:CIII:B, LPAI:E et LPE:A II constituant le deuxième groupe, caractérisé en ce que l'on met le milieu contenant les deux sous-ensembles à doser en présence d'un mélange d'anticorps respectivement dirigés contre l'apolipoprotéine E (anticorps anti E), l'apolipoprotéine C III (anticorps anti CIII) et l'apolipoprotéine B (anticorps anti B), dans des conditions telles que, d'une part, les anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine E soient en excès par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine B, et, d'autre part, les anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine C III soient en excès par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine B, l'excès des anticorps anti C III par rapport aux anticorps anti B pouvant être exprimé par le fait que le produit de la valeur du volume des anticorps anti C III par la valeur du titre des anticorps anti C III soit supérieur au sixième du produit de la valeur du volume des anticorps anti B par la valeur du titre des anticorps anti B, et l'excès des anticorps anti E par rapport aux anticorps anti B pouvant être exprimés par le fait que le produit de la valeur du volume d'anticorps anti E par la valeur du titre des anticorps anti E soit supérieur au douzième du produit de la valeur du volume des anticorps anti B par la valeur du titre des anticorps anti B.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, on dose trois sous-ensembles d'apolipoprotéines appartenant respectivement à trois groupes de particules lipoprotéiques, le premier sous ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine B, appartenant aux particules lipoprotéiques LPB constituant le premier groupe, le deuxième sous-ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine E, appartenant aux particules lipoprotéiques LPB:E constituant le deuxième groupe, et le troisième sous ensemble étant constitué par les apolipoprotéines A I, A II et C III appartenant aux particules lipoprotéiques LPE:CI:CII:CIII:B, LPB:CIII, LPE:AII, LPAI:E, LPAI et LP A I:AII, constituant le troisième groupe, caractérisé en ce qu'on met le milieu contenant les trois sous-ensembles à doser respectivement en présence d'un mélange d'anticorps

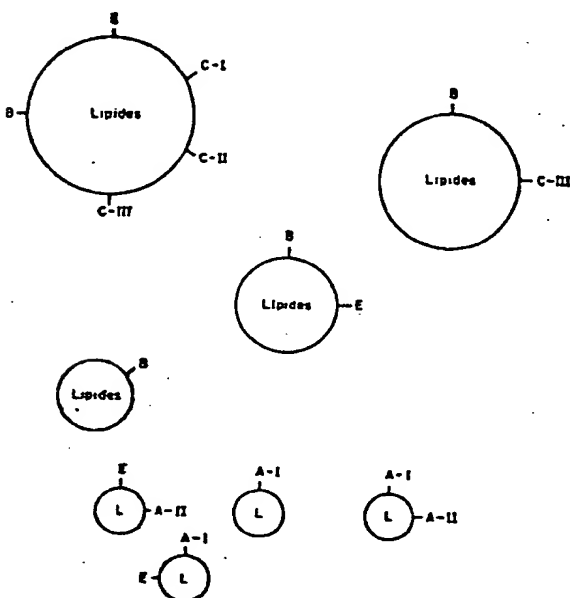
dirigés contre l'apolipoprotéine C III (anticorps anti C III), contre l'apolipoprotéine A II (anticorps anti A II), contre l'apolipoprotéine A I (anticorps anti A I), contre l'apolipoprotéine E (anticorps anti E) et contre l'apolipoprotéine B (anticorps anti B), les anticorps anti C III, anti A II et anti A I étant respectivement en excès par rapport aux anticorps anti E et anti B, et les anticorps anti E étant en excès par rapport aux anticorps anti B.

Selon un autre mode de réalisation préféré du procédé de l'invention, on dose trois sous-ensembles d'apolipoprotéines appartenant respectivement à trois groupes de particules lipoprotéiques, le premier sous-ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine A I, appartenant aux particules lipoprotéiques LPAI constituant le premier groupe, le deuxième sous-ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine A II, appartenant aux particules lipoprotéiques LPAI:AI constituant le deuxième groupe, et le troisième sous-ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine E, appartenant aux particules lipoprotéiques LPE:CI:CII:CIII:B, LPB:E, LPE:AI et LPAI:E, constituant le troisième groupe, caractérisé en ce qu'on met le milieu contenant les trois sous-ensembles à doser respectivement en présence d'un mélange d'anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine E (anticorps anti E), contre l'apolipoprotéine A II (anticorps anti A II) et contre l'apolipoprotéine A I (anticorps anti A I), les anticorps anti E étant respectivement en excès par rapport aux anticorps anti A II et anti A I, et les anticorps anti A II étant en excès par rapport aux anticorps anti E.

La présente invention a encore pour objet l'application de ce nouveau procédé de dosage au dépistage in vitro de maladies, notamment corrélées à des teneurs en apolipoprotéines situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes correspondant généralement à l'état physiologique d'un être humain ou animal sain.

L'invention concerne plus particulièrement des procédés de dépistage in vitro des risques d'athérosclérose corrélés à des teneurs en apolipoprotéine AI, ou en apolipoprotéine CII ou en apolipoprotéine CIII, situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes des susdites protéines correspondant à l'état physiologique d'un individu sain.

On rappelle que la constitution des différentes particules lipoprotéiques d'un sérum humain peut être schématisé comme suit



(cf Fruchart - Ann. Biol. Clin. 1986-44-116-121).

On rappelle ci-après la concentration des valeurs physiopathologiques habituelles des principales apolipoprotéines dans le sérum des sujets adultes.

Apolipoprotéines	Apo A-I	1,10 à 1,60 g/l
	Apo A-II	0,27 à 0,49 g/l
	Apo B <sub>100</sub>	0,7 à 1,3 g/l
	Apo B <sub>48</sub>	concentration négligeable
	Apo C-I	50 à 110 mg/l
	Apo C-II	10 à 67 mg/l
	Apo C-III	40 à 140 mg/l
	Apo E	35 à 73 mg/l

Apo(a) 0,01 à 2 500 mg/l

L'invention concerne avantageusement un procédé de dépistage in vitro des risques d'athérosclérose corrélés à des teneurs en apolipoprotéines AI portés par les particules lipoprotéiques LPAI et LPAI:E situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes des susdites apolipoprotéines correspondant à l'état physiologique d'un individu sain, en mettant en oeuvre le procédé de dosage selon l'invention.

Il a en effet été démontré que le dosage des particules LPAI:E et LPAI était plus significatif que le dosage de l'apolipoprotéine AI totale.

En effet, ces particules peuvent pénétrer dans les cellules et fixer le cholestérol pour l'amener au foie où il sera métabolisé.

Par contre, les particules LpAI:All ne pénètrent pas dans les cellules et seraient même inhibitrices de la pénétration des LPAI et LPAI:E.

L'invention concerne avantageusement un procédé de dépistage in vitro des risques d'athérosclérose corrélés à des teneurs en apolipoprotéines B, portés par les particules lipoprotéiques LPB, situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes des susdites apolipoprotéines correspondant à l'état physiologique d'un individu sain, en mettant en oeuvre le procédé de dosage selon l'invention.

Il a également été démontré que le dosage de la particule LPB est plus représentatif des risques d'athérosclérose que le dosage de l'apolipoprotéine B totale.

L'invention concerne également des supports plans, notamment films ou plaques pour le dosage, prêts à l'utilisation, ainsi que pour le dépistage in vitro de risques pathologiques corrélés à des teneurs anormales en apolipoprotéines contenant un mélange d'anticorps correspondant respectivement à l'obtention du domaine de précipitation des groupes de particules lipoprotéiques portant les sous ensembles de particules à doser.

L'invention concerne également des nécessaires ou kits pour le dosage de sous ensemble d'apolipoprotéine, ainsi que pour le dépistage in vitro des risques pathologiques corrélés à des teneurs anormales en apolipoprotéine qui comprennent

- un support plan, tel qu'un film ou une plaque de gel contenant un mélange d'anticorps correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques contenant respectivement les sous ensembles d'apolipoprotéine à doser,

- une courbe d'étalonnage ou de préférence une solution biologique étalon de préférence à plusieurs dilutions déterminées, avantageusement 3 ou 4 dilutions déterminées contenant une quantité connue de sous ensembles d'apolipoprotéine que l'on veut doser par ailleurs dans un milieu biologique.

En effet, pour faire les dosages de sous ensembles d'apolipoprotéines contenues dans un milieu biologique, on peut avoir recours à une courbe d'étalonnage préalablement établie à partir d'échantillons étalon contenant des quantités déterminées des sous ensembles d'apolipoprotéine, que l'on veut doser par ailleurs dans un milieu biologique.

Il est avantageux d'établir pour chaque film ou plaque de gel, une courbe d'étalonnage et pour ce faire, de disposer de solutions étalon contenant des quantités connues des sous-ensembles d'apolipoprotéines que l'on veut doser par ailleurs dans un milieu biologique en raison des légères variations qui peuvent intervenir lors de l'analyse proprement dite.

On donne ci-après un exemple de réalisation relatif aux dosages des deux sous ensembles des apolipoprotéines AI et AII, le premier sous ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine AI, portée par les particules LPAI:E et LPAI, formant le premier groupe et le deuxième sous ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine AII, portée par les particules LPE:AII et LPAI:AII.

Les essais sont effectués sur des plaques de gel de dimensions 10,3 x 8,3 cm avec une rangée de réservoirs (lieux de dépôt du milieu biologique) disposée à 1,7 cm de la grande dimension et parallèlement à celle-ci, 1 cm de chaque côté étant occupé par les ponts de papier. Il reste 5,5 cm de "hauteur utile" au dessus des réservoirs.

On fixe arbitrairement pour un échantillon normal de milieu biologique, une hauteur de 3,5 cm pour le pic correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI et une hauteur de 1,5 cm pour le pic correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques LPE:AII et LPAI:AII.

Ces valeurs arbitraires de hauteur de pic souhaitable, sont données à titre d'exemple pour montrer la manière dont on peut déterminer les quantités d'anticorps Anti A I et Anti A II, et ne sont en rien limitatives de la technique (dans la mesure où le pic correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques LPE:AII et LPAI:AII reste inférieur au pic correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI).

On détermine tout d'abord la quantité d'anticorps Anti A II à incorporer au gel pour qu'un échantillon normal de milieu biologique donne un pic de hauteur 1,5 cm.

L'échantillon est déposé dans une plaque contenant le volume v2 d'anticorps Anti A II. Après migration, on obtient un pic de hauteur "h". La quantité d'anticorps Anti A II à incorporer sera :



$$h$$

$$V2 = \frac{h}{1,5} \cdot v2$$

5

La détermination de la quantité d'anticorps Anti A I se fait de la même manière en tenant compte en plus du fait que, dans l'échantillon biologique susmentionné, la proportion d'antigène A I portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI représente pour un échantillon normal environ 25 % de la quantité totale d'antigène A I.

10

Si, dans une plaque contenant un volume  $v1$  d'anticorps Anti A I, on obtient un pic de hauteur " $h'$ ", la quantité d'anticorps Anti A I à ajouter à la plaque contenant un volume  $V2$  d'anticorps Anti A II sera :

15

$$h'$$

$$V1 = 0,25 \cdot \frac{h'}{3,5} \cdot v1$$

20

Dans cette plaque contenant un volume  $V1$  d'anticorps Anti A I et un volume  $V2$  d'anticorps Anti II, l'échantillon donnera deux pics :

25

. un pic dont la frontière est la plus proche du point de dépôt de l'échantillon et dont la hauteur est de 1,5 cm (premier pic),

. un pic dont la frontière est la plus éloignée du point de dépôt de l'échantillon et dont la hauteur est de 3,5 cm (deuxième pic).

30

On peut vérifier que la hauteur du premier pic est indépendante de la quantité d'anticorps Anti A II présente dans le gel (dans la mesure où le deuxième pic reste inférieur au premier pic).

Ainsi, si dans un autre gel on incorpore un volume  $V1$  d'anticorps Anti A I et deux volumes  $V2$  d'anticorps Anti A II, on obtient un premier pic de même hauteur et un deuxième pic dont la hauteur est égale à la moitié de celle du pic obtenu avec le volume  $V2$ .

35

On a représenté de façon schématique sur la figure 1, une plaque sur laquelle on a effectué le dosage des deux sous ensembles d'apolipoprotéines AI et AII, comme défini ci-dessus.

La plaque de la figure 1 contient un mélange de 0,8 ml d'anticorps anti AII (de titre 50) et 0,15 ml d'anticorps anti AI (de titre 175).

Les deux premiers pics de gauche et les deux derniers pics de droite correspondent à ceux obtenus avec un sérum étalon, à la dilution  $\frac{1}{20}$  (mentionné par  $\frac{50}{20}$ )

40

On a fait des essais sur 12 échantillons de sérum dans lesquels on veut doser les sous ensembles d'apolipoprotéine A-I et A-II, comme définis ci-dessus. Ces 12 échantillons sont testés à la dilution  $1/20^e$ .

La figure 2 correspond à une plaque contenant un mélange d'anticorps Anti A-I et Anti A-II respectivement de même titre que dans la plaque n° 1, et dans laquelle le volume d'anticorps Anti A-I est le même que celui incorporé dans la plaque de la figure 1, mais dans lequel le volume d'anticorps Anti A-II est le double de celui incorporé dans la plaque de la figure 1.

45

On constate que les pics correspondent à la précipitation, pour chacun des sérums testés, des particules lipoprotéiques du premier groupe sont inchangés tandis que les pics correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ont une hauteur égale à la moitié de la hauteur des pics du deuxième groupe de la première plaque.

50

Pour vérifier la validité du procédé de dosage de l'invention, on peut montrer que le premier pic ne comporte pas d'apolipoprotéine du deuxième sous ensemble, tandis que le premier et le deuxième pics comportent l'apolipoprotéine du premier sous ensemble.

Pour ce faire, on utilise trois plaques de gel, dans lesquelles on introduit un mélange de 0,15 ml d'anticorps Anti AI (titre 220) et de 1 ml d'anticorps Anti AII (titre 60).

55

Les trois premiers pics de gauche correspondent à un sérum étalon dilué, de gauche à droite respectivement, au  $1/20$ , au  $1/10$  et  $1/5^e$  et les trois derniers pics de droite correspondent à un sérum étalon dilué de droite à gauche respectivement au  $1/20$ , au  $1/10$  et au  $1/5$ .

Les dix autres pics correspondent à des sérums à doser, dilués au  $1/10^e$ .

60

Après migration, une des plaques est lavée avec de l'eau physiologique, puis séchée et colorée avec un colorant des protéines, tel que le bleu de Coomassie. On obtient deux pics. C'est ce qui est représenté sur la plaque de la figure 3.

La figure 4 correspond à l'une des autres plaques parmi les trois plaques définies ci-dessus, incubée, après

65

migration, avec une solution d'anticorps monoclonal anti A-II, à raison de 300 µl, marqué à la peroxydase.

La révélation est obtenue à l'aide d'un substrat chromogénique de la peroxydase et seul le pic correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe est observé.

La figure 5 correspond à la dernière plaque, incubée, après migration avec une solution d'anticorps monoclonal anti A-I, à raison de 400 µl. La révélation est obtenue à l'aide d'un substrat chromogénique de la peroxydase et les deux pics correspondant respectivement à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier et du deuxième groupe sont observés.

On a également réalisé 3 plaques, d'immunodiffusion radiale. Chaque plaque contient un mélange de 1 ml d'anticorps anti A-II de titre (60), et de 0,12 ml d'anticorps anti A-I de titre (220).

La figure 6 correspond à la coloration d'une plaque à l'aide de bleu de Coomassie, ce qui donne 2 anneaux. La figure 7 correspond à la révélation d'une des 3 plaques, incubée avec 300 µl d'anticorps anti A-II monoclonal marqué à la peroxydase, et révélée à l'aide d'un substrat chromogène de la peroxydase. On révèle ainsi l'anneau correspondant uniquement à la précipitation du deuxième groupe de particules lipoprotéiques.

La figure 8 correspond à la révélation d'une des 3 plaques incubée avec 400 µl d'anticorps anti A-I monoclonal marqué à la peroxydase et révélée à l'aide d'un substrat chromogène de la peroxydase. On révèle ainsi les anneaux correspondant à la précipitation du premier et du deuxième groupe de particules lipoprotéiques.

#### Exemple 1 :

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 29 ml d'eau déminéralisée. On ajoute 250 mg d'agarose de marque HGT (commercialisé par la Société MCI) et 60 mg d'agarose de marque HEEO (agarose de haute électroendosmose commercialisé par MCI). On chauffe à 95-100°C jusqu'à l'obtention d'une solution parfaitement limpide. On l'équilibre alors à 52-55°C dans un bain thermostaté et on y ajoute 3 ml de tampon Tris Glycine Veronal Veronal Na pH 9,2 de force ionique 0,1 (conductivité du tampon), puis 4 ml d'anticorps anti A-II (titre 60) et 0,6 ml d'anticorps anti A-I (titre 220).

La solution homogénéisée est coulée sur un film plastique de marque Gel bond (commercialisé par FMC) de dimension 10,1 x 8,3 cm à raison de 9 ml/film. Une fois le gel formé, on découpe à l'emporte pièce sur une ligne parallèle à la longueur 16 puits de 3 mm de diamètre.

On obtient ainsi un film prêt à l'emploi pour le dosage de l'apolipoprotéine AI (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) et de l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:AI et LPE:AI), par technique d'électroimmunodiffusion.

Les échantillons à doser, ainsi que la gamme des standards, sont déposés à la dilution au 1/10 à raison de 3 µl/puits. Après 3 heures de migration sous 150 volts et lavage en eau physiologique, séchage et coloration au bleu de Coomassie, on obtient, pour chaque échantillon, 2 pics dont le plus grand et le moins coloré correspond à la l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI), le plus petit et le plus coloré correspond à l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:AI et LPE:AI).

#### Exemple 2 :

On opère comme à l'exemple 1, à la différence que l'on ajoute 6 ml d'anticorps anti A-II (titre 60). Après migration des mêmes échantillons que ceux de l'exemple 1, on obtient un pic correspondant à l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) de même hauteur qu'à l'exemple 1 et un pic correspondant à l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:AI et LE:AI) et de hauteur divisée 1,5 par rapport à l'exemple 1.

#### Exemple 3 :

On opère comme à l'exemple 1, à la différence que l'on ajoute 4 ml d'anticorps anti A-II de titre 120 et 0,6 ml d'anticorps anti A-I de titre 330.

Après migration, les memes échantillons qu'à l'exemple 1 donnent un pic correspondant à l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) en hauteur divisée par 1,5 par rapport à l'exemple 1 et un pic correspondant à l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:AI et LPE:AI) dont la hauteur est divisée par 2 par rapport à l'exemple 1.

#### Exemple 4 :

On opère comme à l'exemple 1. Après migration, le gel est recouvert pendant 3 heures d'un papier filtre imprégné d'une solution d'un anticorps monoclonal anti A-II, marqué à la peroxydase.

Après lavage en eau physiologique pendant une nuit, et révélation de l'activité peroxydasique, seul le petit pic est coloré qui correspond à l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:AI et LPE:AI).

#### Exemple 5 :

On opère comme à l'exemple 3, mais le papier filtre est imprégné d'un anticorps monoclonal anti A-I, marqué à la peroxydase. La révélation de l'activité peroxydasique colore dans ce cas les deux pics correspondant respectivement à l'apolipoprotéine A I ((portée par les particules lipoprotéiques LpAI:E et LpAI) et à l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:AI et LPE:AI).

**Exemple 6 :**

On opère comme à l'exemple 1, à la différence que l'on coule 12 ml par film. On découpe 12 puits de diamètre 3 mm équidistants et répartis sur l'ensemble de la surface du gel. On obtient ainsi un film prêt à l'emploi utilisable pour le dosage de l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) dans la technique d'immunodiffusion radiale.

5 µl des échantillons et des standards sont déposés à la dilution 1/10. Après 48 heures de diffusion, lavage en eau physiologique pendant une nuit, séchage et coloration au noir amide, on obtient pour chaque échantillon 2 anneaux, dont le plus grand et le moins coloré correspond à l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) et le plus petit et le plus coloré à l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:All et LPE:All).

**Exemple 7 :**

On opère comme à l'exemple 1 à la différence que l'on ajoute à la solution d'agarose 1 ml d'anticorps Anti E (titre 60) 2,8 ml d'anticorps Anti CIII (titre 40µ et 0,11 ml d'anticorps Anti B (titre 2000) On obtient ainsi un film prêt à l'emploi pour le dosage par immunodiffusion de la l'apolipoprotéine B portée par la particule lipoprotéique LPB.

**Exemple 8 :**

On réalise une plaque déshydratée et réhydratable selon le brevet américain n° 2 086 541 du 01/04/70 et le brevet français n° 76 22802 du 27/07/76.

Dans un erlenmeyer de 50 ml, on introduit 30 ml d'eau déminéralisée et on ajoute sous agitation magnétique 1,8 g de D sorbitol, 90 mg de Separan NP10 commercialisé par la Société MCI (Marine Colloids Incorporation) et 45 mg de Separan MGL commercialisé par la Société MCI. Après solubilisation complète, on ajoute 250 mg d'agarose HGT et 70 mg d'agarose HEEO.

On chauffe la solution à 95-100°C jusqu'à solubilisation totale. Après avoir ramené la température à 53°C, on ajoute 4 ml d'anticorps anti A-II (titre 60) et 0,6 ml d'anticorps anti A-I (titre 220). La solution est répartie à raison de 9 ml/film. Après gélification, on découpe à l'emporte pièce 28 puits de diamètre 2 mm.

On place le film dans un flux d'air laminaire pendant une nuit. On obtient ainsi un film sec et réhydratable utilisable pour le dosage de l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) et de l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:All et LPE:All).

**Exemple 9 :**

On opère comme à l'exemple 8, à la différence que l'on remplace les 250 mg HGT et les 70 mg HEEO par 300 mg d'agaragar et l'hétéropolymère basique par du Séparan CP35 commercialisé par la Société MCI. On répartit la solution à raison de 12 ml/film. On découpe 12 puits de 2,5 mm de diamètre équidistants et disposés sur l'ensemble de la surface du gel.

Après déshydratation, on obtient un film sec et réhydratable utilisable pour le dosage de l'apolipoprotéine A I (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:E et LPAI) et de l'apolipoprotéine A II (portée par les particules lipoprotéiques LPAI:All et LPE:All) par technique d'immunodiffusion radiale.

**Revendications**

1. Procédé de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque d'au moins trois sous-ensembles d'apolipoprotéines, appartenant respectivement à des groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces trois groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune", et pouvant être définis de la façon suivante :

- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", et portant d'éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$ , cette "apolipoprotéine commune" portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous-ensemble,

- un autre groupe, ci-après désigné par deuxième groupe ou groupe intermédiaire, étant tel que :

- soit il est constitué de préférence par des particules lipoprotéiques portant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus, et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous ensemble ou le sous ensemble intermédiaire,

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont d'une part une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune", constituant le premier sous ensemble, et porte, en outre, au moins une apolipoprotéine  $Z_p$ , différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune", mais porte au moins une des apolipoprotéines  $Z_p$  portées par la partie des particules lipoprotéiques sus-définie et différentes des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par le premier groupe d' particules lipoprotéiques, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Z_p$

constituant le deuxième sous ensemble, ou le sous ensemble intermédiaire,

- le troisième groupe, ou dernier groupe, étant tel que :

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" défini ci-dessus et contenant en outre au moins une apolipoprotéine  $W_q$ , différente d'une part des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et d'autre part des apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $W_q$  constituant le troisième sous-ensemble, ou dernier sous ensemble ;

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" et porte en outre au moins une apolipoprotéine  $T_i$  différente à la fois des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, et des apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune", mais porte l'une au moins des apolipoprotéines  $T_i$  portées par la partie des particules lipoprotéiques susdéfinie, cette ou ces apolipoprotéines  $T_i$  constituant le troisième sous-ensemble, ou dernier sous ensemble ;

caractérisé en ce que :

- on met le milieu biologique contenant les sous-ensembles à doser en présence d'un mélange d anticorps contenant

. des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le troisième ou dernier sous ensemble en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du troisième ou dernier groupe ;

. des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble, ou sous ensemble intermédiaire, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, ou groupe intermédiaire ;

. des anticorps dirigés contre "l'apolipoprotéine commune" aux sous-ensembles, et constituant le premier sous ensemble, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe ;

- la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du troisième ou dernier groupe étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ou groupe intermédiaire, cette dernière quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ou groupe intermédiaire étant elle-même en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques portant "l'apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne trois frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les sous-ensembles à doser, correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du troisième ou dernier groupe, la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, la frontière d'immunodiffusion intermédiaire entre la frontière la plus proche et la frontière la plus éloignée sus-mentionnées correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe ;

- on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des trois frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des trois sous-ensembles.

2. Procédé selon l'invention de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque d'au moins deux sous-ensembles d'apolipoprotéines, appartenant respectivement à au moins deux groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces deux groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune",

- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", et portant d'éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$ , cette apolipoprotéine commune portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous-ensemble,

- l'autre groupe, ci-après désigné par deuxième groupe étant tel que :

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous-ensemble ;

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble et porte, en outre, au moins une apolipoprotéine  $Z_p$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous ensemble mais porte l'une au moins des apolipoprotéines  $Z_p$  portées par la partie des particules lipoprotéiques susdéfinie et différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par le premier groupe de particules lipoprotéiques, cette ou ces apolipoprotéines  $Z_p$  constituant le deuxième sous-ensemble ; caractérisé en ce que :

- on met le milieu biologique contenant les deux sous-ensembles d'apolipoprotéine à doser en

présence d'un mélange d'anticorps contenant

. d'une part des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble ( $Y_n$  ou  $Z_p$ ) en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe ;

. d'autre part des anticorps dirigés contre la susdite "apolipoprotéine commune", constituant le premier sous-ensemble, en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe ;

- la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne deux frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les deux sous-ensembles à doser correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe et la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ces deux frontières étant respectivement identiques à celles obtenues dans les conditions où, après avoir séparé les deux groupes de particules lipoprotéiques contenant respectivement le premier et le deuxième sous-ensembles d'apolipoprotéines, on met, d'une part, le premier groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous-ensemble défini ci-dessus, en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe, non séparées du milieu biologique et portant l'apolipoprotéine constituant le premier sous-ensemble, et on met, d'autre part, le deuxième groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble défini ci-dessus, en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, non séparées du milieu biologique et portant les apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble ;

- on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des deux frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu biologique étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des deux sous-ensembles.

3. Procédé selon l'invention de dosage simultané par immunodiffusion différentielle sur gel en plaque de deux sous-ensembles d'apolipoprotéine, appartenant respectivement à deux groupes de particules lipoprotéiques contenues dans un milieu biologique, ces deux groupes de particules lipoprotéiques étant tels qu'ils contiennent une "apolipoprotéine commune",

- l'un des groupes ci-après appelé premier groupe étant constitué par des particules lipoprotéiques portant toutes la susdite "apolipoprotéine commune", et portant d'éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$ , cette apolipoprotéine commune portée par toutes les particules lipoprotéiques du premier groupe constituant le premier sous-ensemble, et l'autre groupe, ci-après désigné par deuxième groupe étant tel que :

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques contenant toutes "l'apolipoprotéine commune" définie ci-dessus et portant en outre au moins une apolipoprotéine  $Y_n$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, cette ou ces apolipoprotéine(s)  $Y_n$  constituant le deuxième sous-ensemble ;

- soit il est constitué par des particules lipoprotéiques dont, d'une part, une partie porte la susdite "apolipoprotéine commune" du premier groupe et porte en outre au moins une apolipoprotéine  $Z_p$  différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe et dont, d'autre part, le reste des particules lipoprotéiques ne porte pas la susdite "apolipoprotéine commune" constituant le premier sous-ensemble, mais porte l'une au moins des apolipoprotéines  $Z_p$  portées par la partie des particules lipoprotéiques susdéfinie et différente des éventuelles autres apolipoprotéines  $X_m$  portées par le premier groupe de particules lipoprotéiques, cette ou ces apolipoprotéines  $Z_p$  constituant le deuxième sous-ensemble ;

caractérisé en ce que

- on met le milieu biologique contenant les deux sous-ensembles d'apolipoprotéine à doser en présence d'un mélange d'anticorps contenant

. d'une part des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble ( $Y_n$  ou  $Z_p$ ) en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe ;

. d'autre part des anticorps dirigés contre "l'apolipoprotéine commune" aux deux sous-ensembles en quantité suffisante pour précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe ;

- la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe étant en excès par rapport à la quantité des susdits anticorps nécessaires à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, dans un rapport tel que, après immunodiffusion, on obtienne deux frontières distinctes, la frontière d'immunodiffusion la plus proche du point de dépôt du milieu contenant les deux sous-ensembles à doser correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe et la frontière d'immunodiffusion la plus éloignée du susdit point de dépôt correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ces deux frontières étant respectivement identiques à celles obtenues dans les conditions où, après avoir

séparé les deux groupes de particules lipoprotéiques contenant respectivement le premier et le deuxième sous-ensembles d'apolipoprotéines, on met, d'une part, le premier groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine commune du premier groupe en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques et non séparées du milieu biologique, portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, et on met, d'autre part, le deuxième groupe de particules lipoprotéiques en contact avec des anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, différente(s) de l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe en quantité identique à celle utilisée ci-dessus pour précipiter les particules lipoprotéiques et non séparées du milieu biologique, portant les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble ;

- on mesure les distances maximales respectives entre le point de dépôt et chacune des deux frontières d'immunodiffusion et on compare chacune des distances par rapport à celles obtenues avec un milieu biologique étalon, contenant des quantités connues d'apolipoprotéines respectives des deux sous-ensembles.

4. Procédé de dosage selon la revendication 3, dans lequel l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble appartient à des particules lipoprotéiques libres et identiques, constituant le premier groupe.

5. Procédé de dosage selon la revendication 3, dans lequel le premier groupe est constitué d'une part par des particules lipoprotéiques libres et identiques entre elles, portant l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous ensemble et, d'autre part, par des particules lipoprotéiques complexes, portant outre la susdite apolipoprotéine commune, au moins une apolipoprotéine différente de la susdite apolipoprotéine commune, et différente des apolipoprotéines constituant le deuxième sous-ensemble.

6. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel le deuxième sous-ensemble est constitué par une apolipoprotéine différente de l'apolipoprotéine commune constituant le premier sous ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, laquelle apolipoprotéine est portée par des particules lipoprotéiques complexes, portant en outre toutes la susdite apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble.

7. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, dans lequel le deuxième sous-ensemble est constitué par au moins une apolipoprotéine différente de l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, laquelle apolipoprotéine est portée d'une part par des particules complexes, portant en outre l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble, et portée d'autre part par des particules lipoprotéiques simples ou complexes ne portant pas l'apolipoprotéine constituant le premier sous ensemble.

8. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel l'immunodiffusion différentielle est effectuée par électroimmunodiffusion selon la méthode de Laurell, ce qui conduit à l'obtention de deux pics.

9. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 par immunodiffusion radiale selon la méthode de Mancini, ce qui conduit à l'obtention de deux anneaux.

10. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 9, dans lequel la quantité minimale d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble à utiliser est déterminée dès l'apparition de deux frontières distinctes d'immunodiffusion et est avantageusement située dans une gamme dont la valeur minimale est déterminée dès l'apparition de deux frontières distinctes d'immunodiffusion et dont la valeur maximale est déterminée dès que les particules lipoprotéiques portant les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble ne diffusent plus et sont précipitées sur le point de dépôt du milieu biologique, la frontière d'immunodiffusion correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble n'étant pas modifiée lorsque la quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est supérieure à la valeur minimum ci-dessus définie.

11. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 10, dans lequel la quantité d'anticorps dirigés contre la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est telle que la distance maximale entre le point de dépôt et la frontière d'immunodiffusion correspondant la précipitation des particules lipoprotéiques contenant les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble est d'environ 1/2 à environ 1/8, avantageusement d'environ 1/3 à environ 1/4, de la distance maximale entre le point de dépôt et la frontière d'immunodiffusion correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques contenant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble.

12. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 11, dans lequel l'étalonnage est effectué à partir d'un milieu dans lequel le premier sous-ensemble contient une quantité connue (A) d'apolipoprotéine, laquelle est commune aux deux groupes, le deuxième sous-ensemble contient une ou des quantités connues (B), d'apolipoprotéine(s) différente(s) de l'apolipoprotéine commune aux deux groupes et différente des éventuelles autres apolipoprotéines appartenant aux particules lipoprotéiques du premier groupe :

- en mettant sur la plaque des anticorps dirigés contre chacune des apolipoprotéines du deuxième



sous-ensemble en quantité nécessaire pour précipiter les particules lipoprotéiques du deuxième groupe, chacune de ces quantités étant respectivement en excès par rapport aux anticorps nécessaires à précipiter les particules lipoprotéiques du premier groupe, l'excès en anticorps dirigés contre les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble pouvant être exprimé par la relation suivante :

$$V_{2i} T_{2i} \times \frac{B_i}{A} \text{ supérieur à } V_1 T_1,$$

dans laquelle  $V_1$ ,  $T_1$  représentent respectivement le volume et le titre des anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble et  $V_{2i}$ ,  $T_{2i}$  représentent respectivement les volumes et les titres des anticorps dirigés respectivement contre chacune des apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble.

13. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 12, dans lequel on détermine :  
- la quantité d'anticorps  $V_1$ , destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, laquelle apolipoprotéine est commune aux deux groupes, pour que la hauteur du pic obtenue soit  $H_1$  en mettant sur la plaque une quantité d'anticorps  $v_1$  correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe, ce qui donne une hauteur  $h_1$ , la quantité  $V_1$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_1 = x \% \frac{h_1 v_1}{H_1}$$

$x\%$  représentant le pourcentage de l'apolipoprotéine commune aux deux groupes contenue dans le premier sous-ensemble, par rapport à la quantité totale de cette apolipoprotéine contenue dans le milieu, et on détermine

- la quantité d'anticorps  $v_2$  destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, lesquelles sont différentes de l'apolipoprotéine commune aux deux groupes et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, pour que la hauteur du pic obtenue soit  $h_2$ , en mettant sur la plaque une quantité d'anticorps  $v_2$  correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du deuxième groupe, ce qui donne une hauteur  $h_2$ , la quantité  $v_2$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$v_2 = \frac{h_2 v_2}{H_2}$$

14. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 12, dans lequel on détermine :  
- la quantité d'anticorps  $V_1$  destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant l'apolipoprotéine du premier sous-ensemble, laquelle apolipoprotéine est commune aux deux groupes, pour que le diamètre de l'anneau obtenu soit  $D_1$  en mettant dans la plaque une quantité d'anticorps  $v_1$  correspondant à la précipitation des particules lipoprotéiques du premier groupe ce qui donne un diamètre  $d_1$ , la quantité  $V_1$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_1 = x \% \frac{d_1^2}{D_1^2} v_1$$

x% représentant le pourcentage de l'apolipoprotéine commune aux deux groupes et contenue dans le premier sous-ensemble par rapport à la quantité totale de cette apolipoprotéine contenue dans le milieu, - la quantité d'anticorps  $V_2$  destinés à précipiter les particules lipoprotéiques portant la ou les apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, lesquelles sont différentes de l'apolipoprotéine commune aux deux groupes et différente des éventuelles autres apolipoprotéines portées par les particules lipoprotéiques du premier groupe, pour que le diamètre de l'anneau obtenu soit  $D_2$ , est déterminée en mettant dans la plaque une quantité d'anticorps  $v_2$  correspondant à la précipitation des apolipoprotéines du deuxième sous-ensemble, ce qui donne un diamètre  $d_2$ , la quantité  $V_2$  étant alors calculée selon la formule suivante :

$$V_2 = \frac{d_2^2 v_2}{d_2^2}$$

15. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 14, dans lequel le premier sous-ensemble est constitué par l'apolipoprotéine A I, portée par les particules lipoprotéiques LP A I et LP A I:E, constituant le premier groupe et le deuxième sous-ensemble est constitué par l'apolipoprotéine A II, portée par les particules lipoprotéiques LP A I:A II et LPE:A II, constituant le deuxième groupe, caractérisé en ce que l'on met le milieu contenant les deux sous-ensembles à doser en présence d'un mélange d'anticorps respectivement dirigés contre l'apolipoprotéine A II (anticorps anti A II), et contre l'apolipoprotéine A I (anticorps anti A I), dans des conditions telles que les anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine A II soient en excès par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine A I, cet excès correspondant notamment au fait que le produit de la valeur du volume d'anticorps anti A II mis sur la plaque par la valeur du titre des anticorps anti A II, est supérieur au produit de la valeur du volume d'anticorps anti A I mis sur la plaque par la valeur du titre des anticorps anti A I.

16. Procédé de dosage selon l'une quelconque des revendications 3 à 14, dans lequel le premier sous-ensemble est constitué par l'apolipoprotéine B portée par les particules lipoprotéiques LPB, constituant le premier groupe et le deuxième sous-ensemble est constitué par les deux apolipoprotéines E et C III, portées par les particules lipoprotéiques LPB:E, LPB:CIII, LPE:CI:CII:CIII:B, LPAI:E et LPE:A II constituant le deuxième groupe, caractérisé en ce que l'on met le milieu contenant les deux sous-ensembles à doser en présence d'un mélange d'anticorps respectivement dirigés contre l'apolipoprotéine E (anticorps anti E), l'apolipoprotéine C III (anticorps anti CIII) et l'apolipoprotéine B (anticorps anti B), dans des conditions telles que les anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine E soient en excès par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine B, et les anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine C III soient en excès par rapport aux anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine B, l'excès des anticorps anti C III par rapport aux anticorps anti B pouvant être exprimé par le fait que le produit de la valeur du volume d'anticorps anti C III par la valeur du titre des anticorps anti C III soit supérieur au sixième du produit de la valeur du volume des anticorps anti B par la valeur du titre des anticorps anti B, et l'excès des anticorps anti E par rapport aux anticorps anti B pouvant être exprimés par le fait que le produit de la valeur du volume d'anticorps anti E par la valeur du titre des anticorps anti E soit supérieur au douzième du produit de la valeur du volume des anticorps anti B par la valeur du titre des anticorps anti B.

17. Procédé de dosage selon la revendication 1, dans lequel on dose trois sous ensembles d'apolipoprotéines appartenant respectivement à trois groupes de particules lipoprotéiques, le premier sous-ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine B, appartenant aux particules lipoprotéiques LPB constituant le premier groupe, le deuxième sous-ensemble étant constitué par l'apolipoprotéine E, appartenant aux particules lipoprotéiques LPB:E constituant le deuxième groupe, et le troisième sous ensemble étant constitué par les apolipoprotéines A I, A II et C III appartenant aux particules lipoprotéiques LPE:CI:CII:CIII:B, LPB:CIII, LPE: AII, LPAI:E, LPA I et Lp A I:AII, constituant le troisième groupe, caractérisé en ce qu'on met le milieu contenant les trois sous-ensembles à doser respectivement en présence d'un mélange d'anticorps dirigés contre l'apolipoprotéine C III (anticorps anti C III), contre l'apolipoprotéine A II (anticorps anti A II), contre l'apolipoprotéine A I, contre l'apolipoprotéine E

(anticorps anti A I) et contre l'apolipoprotéine B (anticorps anti B), les anticorps anti C III, anti A II et anti A I étant respectivement en excès par rapport aux anticorps anti E et anti B, et les anticorps anti E étant en excès par rapport aux anticorps anti B.

18. Procédé de dépistage in vitro de maladies, notamment corrélées à des teneurs en apolipoprotéines situées à l'extérieur du domaine délimité par les valeurs extrêmes correspondant généralement à l'état physiologique d'un être humain ou animal sain.

19. Support, notamment plaque ou film recouvert de gel prêt à être utilisé pour la mise en oeuvre du procédé de dosage ou du procédé de dépistage, selon les revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'elle comporte un mélange d'anticorps correspondant respectivement à l'obtention du domaine de précipitation des particules lipoprotéiques portantiles apolipoprotéines à doser.

20. Kit ou nécessaire de dosage contenant un support, notamment plaque ou film recouvert de gel, selon la revendication 19, et au moins une solution étalon, ayant une dilution déterminée, et de préférence à plusieurs dilutions déterminées, avantageusement à trois ou quatre dilutions déterminées.

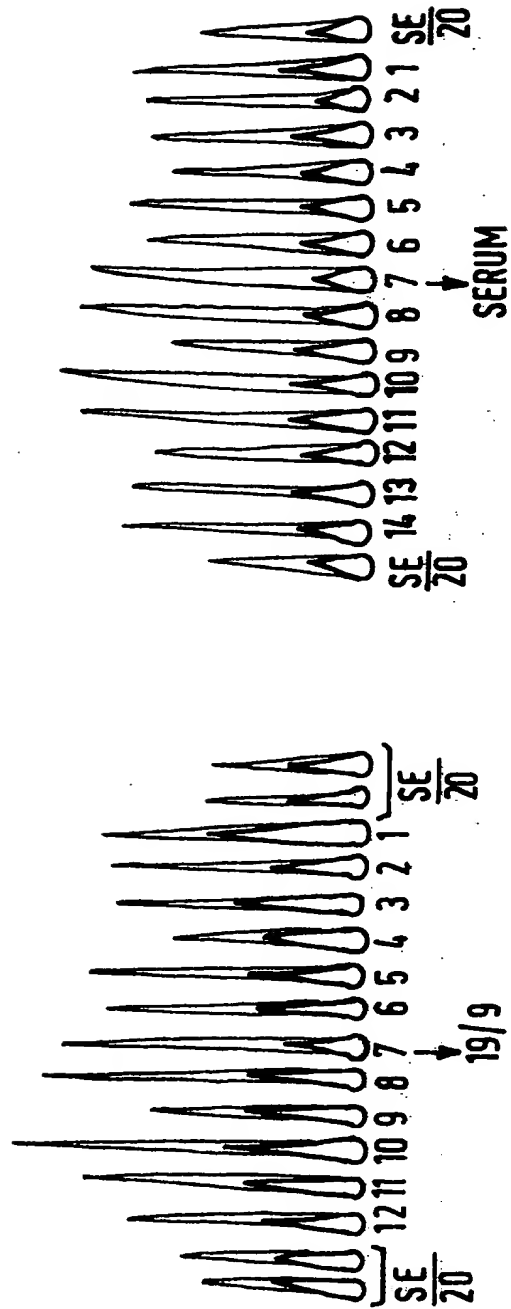


FIG. 1

FIG. 2

0282412

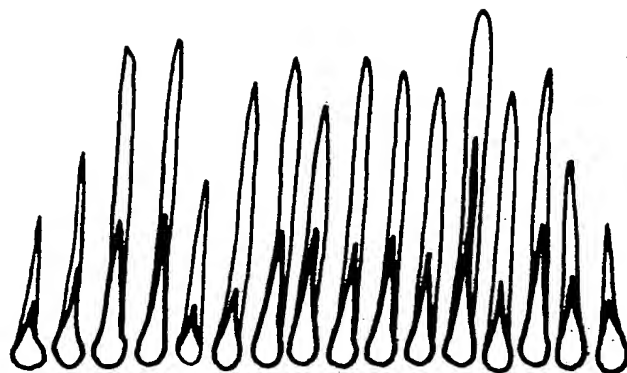


FIG.3

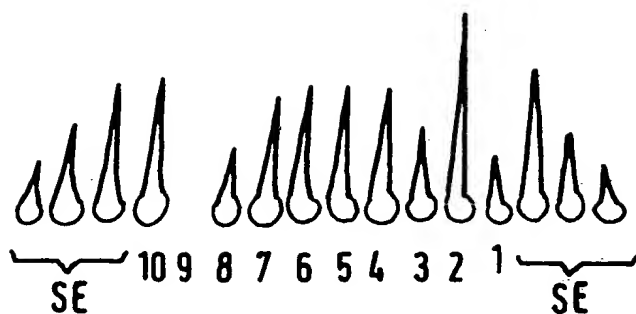


FIG.4

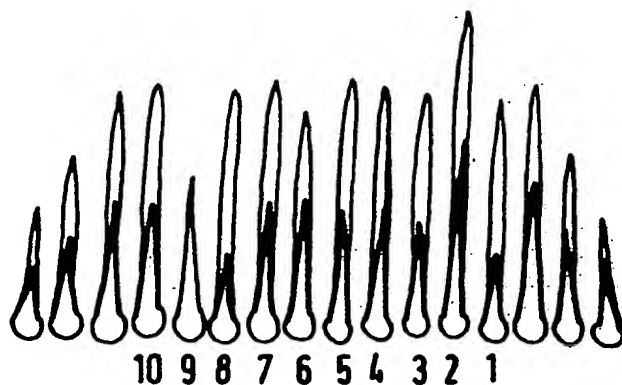


FIG.5

0282412

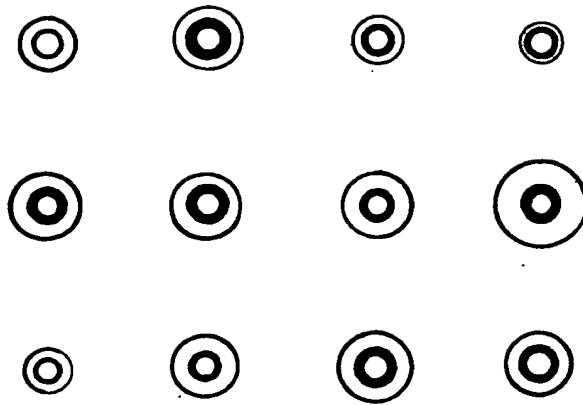


FIG. 6

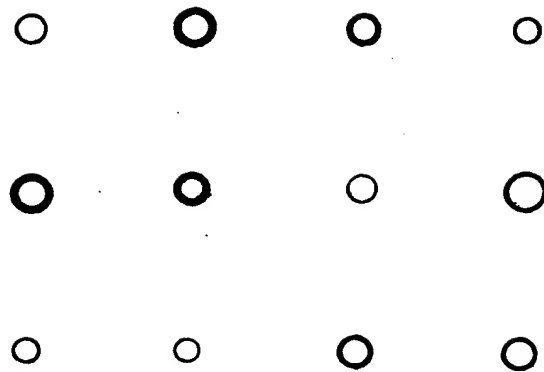


FIG. 7

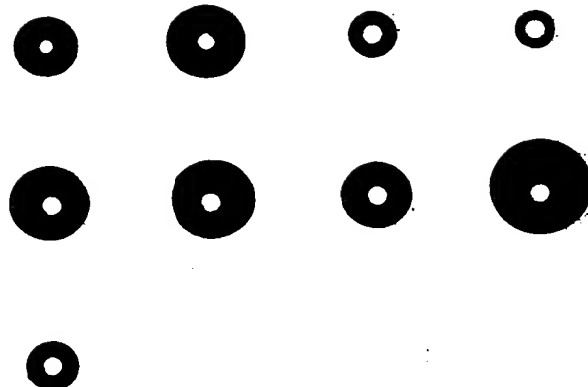


FIG. 8







Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPÉENNE

Numero de la demande

EP 88 40 0555

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
A,D	CLINICAL CHEMISTRY, vol. 28, no. 1, janvier 1982, pages 59-62, Easton, Pennsylv., US; J.-C. FRUCHART et al.: "Simultaneous measurement of plasma apolipoproteins A-1 and B by electroimmunoassay" * En entier * ---	1-20	G 01 N 33/92 G 01 N 33/559 G 01 N 33/561
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 4, 1980, page 2202, résumé no. 20955, Philadelphia, PA., US; D. BIOUS et al.: "Influence of various factors on the immunochemical behavior of alpha1-acid glycoprotein" & CLIN. BIOCHEM. 13(1) 17-23, 1980 * Résumé * ---	8,9	
A	EP-A-0 129 696 (BOEHRINGER MANNHEIM GmbH) * Pages 1-3 * ---	1	
A	WO-A-8 604 144 (INTERNATIONAL GENETIC ENGINEERING INC.) -----		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)  G 01 N
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 10-05-1988	Examineur HITCHEN C.E.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>  X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire  T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant			